

**BEST AVAILABLE COP****Penicillin G acylase, a gene encoding the same and a method for the production of this enzyme**Patent Number:  US5168048

Publication date: 1992-12-01

Inventor(s): QUAX WILHELMUS J [NL]

Applicant(s): GIST BROCADES NV [NL]

Requested Patent:  JP4228073

Application Number: US19910687400 19910418

Priority Number(s): EP19900200962 19900418; EP19900203463 19901220

IPC Classification: C07H21/04; C12N1/21; C12N15/09; C12P21/02

EC Classification: C12N9/84

Equivalents: DK453047T,  IE68078,  IE911294, KR152667,  PT97397

---

**Abstract**

---

The invention provides a gene encoding penicillin G acylase, the enzyme encoded by said gene and a method for the production of said enzyme by incorporating said gene in a host and bringing the same to expression. The gene is preferably obtained from a strain of the microorganism Alcaligenes faecalis.

Data supplied from the **esp@cenet** database - I2

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平4-228073

(43)公開日 平成4年(1992)8月18日

(51)Int.Cl.<sup>a</sup>  
C 12 N 9/84  
1/21  
15/55  
// (C 12 N 9/84

識別記号 庁内整理番号  
Z NA  
8828-4B

F I

技術表示箇所

C 12 N 15/00

A

審査請求 未請求 請求項の数18(全 16 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平3-179436  
(22)出願日 平成3年(1991)4月18日  
(31)優先権主張番号 90200962.0  
(32)優先日 1990年4月18日  
(33)優先権主張国 オランダ(NL)  
(31)優先権主張番号 90203463.6  
(32)優先日 1990年12月20日  
(33)優先権主張国 オランダ(NL)

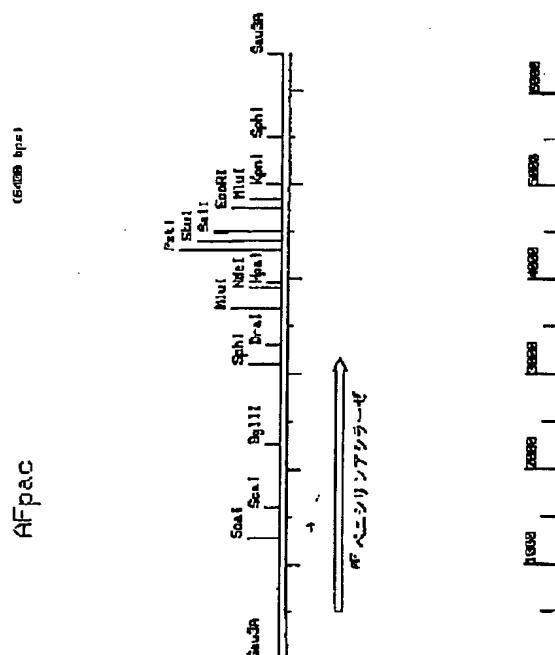
(71)出願人 591004434  
ギスト ブロカデス ナムローゼ フエン  
ノートシャツブ  
オランダ国 2600エムア デルフト ベー  
オーポツクス1 ワーテリングセウエーグ  
1  
(72)発明者 ウイルヘルムス ヨハネス クワツクス  
オランダ国 2253ヴェーベー フォールシ  
ヨツテン ヤン フアン ハーレンラーン  
8  
(74)代理人 弁理士 中村 稔 (外7名)

(54)【発明の名称】ペニシリングアシラーゼ、それをコードする遺伝子及び該酵素の製造方法

(57)【要約】

【目的】高い効率でペニシリングアシラーゼを発現する、該酵素をコードする遺伝子、及び該遺伝子の発現方法を提供する。

【構成】実質的に配列リスト1に記載のヌクレオチド配列を有するペニシリングアシラーゼをコードする遺伝子、及び該遺伝子を宿主に導入し発現させることからなるペニシリングアシラーゼの製造方法。該遺伝子は、好みしくは、微生物A l c a l i g e n e s f a e c a l i sの株から得られる。



1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列リスト1に記載のヌクレオチド配列を実質的に有するペニシリンGアシラーゼをコードする遺伝子。

【請求項2】 *Alcaligenes faecalis*から単離された請求項1記載の遺伝子。

【請求項3】 請求項1又は2記載のペニシリンGアシラーゼ遺伝子の転写調節配列。

【請求項4】 請求項1又は2記載のペニシリンGアシラーゼ遺伝子の翻訳調節配列。

【請求項5】 転写及び／又は翻訳調節配列を含むレギュロンの制御下にある請求項1又は2記載の遺伝子であって、該調節配列の一方又は両方がそれと同じ又は異なる生物から得られた他の転写及び／又は翻訳調節配列に置き換えられている前記遺伝子。

【請求項6】 請求項1、2又は5記載のペニシリンGアシラーゼ遺伝子を1以上含むベクター。

【請求項7】 ペニシリンGアシラーゼ遺伝子の転写配列が*trp*プロモーターで置換されている請求項6記載のベクター。

【請求項8】 請求項6又は7記載のベクターを含む形質転換宿主。

【請求項9】 グラム陰性微生物である請求項8記載の形質転換宿主。

【請求項10】 微生物が*Alcaligenes*属又は*Escherichia*属のものである請求項9記載の形質転換宿主。

【請求項11】 微生物が*Alcaligenes faecalis*である請求項10記載の形質転換宿主。

【請求項12】 請求項8から11のいずれかに記載の形質転換宿主を培養し、単離形態のペニシリンGアシラーゼを回収することからなるペニシリンGアシラーゼの製造方法。

【請求項13】 請求項1から5のいずれかに記載の遺伝子によりコードされたアミノ酸配列から実質的になる単離された形態のペニシリンGアシラーゼ。

【請求項14】 固定化された形態の請求項13記載のペニシリンGアシラーゼ。

【請求項15】 (1) 請求項6又は7記載のDNAベクターを調製し、

(11) 該ベクターで宿主を形質転換し、

(111) 得られた形質転換体をクローニングし選択することからなる、宿主中でペニシリンGアシラーゼを産生又はその産生を増強する方法。

【請求項16】 グラム陰性の微生物を形質転換することを特徴とする請求項15記載の方法。

【請求項17】 *Alcaligenes*属又は*Escherichia*属の微生物を形質転換することを特徴とする請求項16記載の方法。

【請求項18】 *Alcaligenes faecalis* 50

1sを形質転換することを特徴とする請求項17記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

【産業上の利用分野】 本発明は、ペニシリンGアシラーゼをコードする遺伝子、該遺伝子によりコードされたペニシリンGアシラーゼ及び酵素の製造方法に関する。

【先行技術】 ペニシリンGアシラーゼ（ペニシリニアミダーゼとも称されるベンジルペニシリニアミドヒドロラーゼ、EC 3. 5. 1. 11）は、ペニシリンG又は3-デスマセトキシセファロスボリンGを、半合成ペニシリン及びセファロスボリンの工業的生産の最も重要な中间体であるフェニル酢酸と6-アミノペニシラン酸（6-APA）又は7-アミノデスマセトキシセファロスボラン酸（7-ADCA）のそれぞれに加水分解するのに産業上使用されている酵素である。この酵素は、逆反応、即ち6-APA及び7-ADCAを有機エステルでN-アシル化してそれぞれ対応するN-アセチル化ペニシリン及び3-セフェム化合物を产生する反応も触媒する。Vandamme, E. J., Microbial Enzymes and Bioconversion 中の研究、E. H. Rose (Ed.), Economic Microbiology 5, 467-552 (1980); 及びP. B. Mahajan, Appl. Biochem. Biotechnol. 1, 83-86 (1982) を参照のこと。ペニシリンG及び3-デスマセトキシセファロスボリンGの脱アシル化に有用なペニシリンGアシラーゼ产生株として種々のタイプの微生物が文献に提案されている。これらのアシラーゼ产生株の例は、*Escherichia coli*, *Kluyvera citrophila*及び*Prot eus rettgeri*種のいくつかの株である。*Alcaligenes faecalis*の全細胞フラクション中のペニシリンGアシラーゼ活性が報告されていることも挙げられる (C. A. Claveridge et al., Nature 473, 237-238 (1960))。しかしながら、*Alcaligenes faecalis*からのこの活性を司る酵素は今まで報告されたことはない。組換DNA法の使用は、産業上使用されるペニシリンGアシラーゼの生産レベルを上げることを可能にし (Mayer et al., Adv. Biotechnol. 1, 83-86 (1982)), これらの酵素のプロセッシングについての考察を拡大した (Schumacher et al., Nucleic Acids Res. 14, 5713-5727 (1986))。*E. coli*のペニシリンGアシラーゼは、巨大な前駆体タンパク質として产生され、この前駆体はさらに小さい (α) サブユニット及び大きい (β) サブユニットを構成するペリプラスマシック成熟タンパク質にプロセッシングされることが判明した。*Kluyvera citrophila*ア

3

シラーゼ遺伝子をクローン化及び配列決定したところ、*E. coli*アシラーゼ遺伝子とよく一致していることが判明している (J. L. Barbero et al., Gene 49, 69-80 (1986))。*P. rettgeri*ベニシリングアシラーゼ遺伝子についても、小さなサブユニットと大きなサブユニットが記載されている (G. O. Daumy et al., Gene 49, 69-80 (1986)) ; スペイン特許出願No. 8602983)。

【発明の構成】本発明の一つの形態によれば、図1に示す構造を実質的に有する、ベニシリングアシラーゼをコードする遺伝子が提供される。遺伝子は好ましくは*A. faecalis*から得られるものである。本発明の別の形態によれば、前記遺伝子を含むベクターが提供される。また該遺伝子の1以上のコピーを含む宿主系も提供される。本発明はさらに、転写及び/又は翻訳調節配列を含むレギュロンの制御下にあり、該調節配列の一方又は両方がそれぞれ他の転写及び/又は翻訳調節配列に置き換えられている遺伝子を提供する。これら後者の調節配列は、同じ又は異なる生物から得られたものとすることができます。本発明はさらに、上記に示した制御配列に関して操作された、前記ベニシリングアシラーゼ遺伝子を含むベクター、及び該ベクターを含む宿主を提供する。該遺伝子の発現により得られたベニシリングアシラーゼ酵素は極めて良好な安定性と高い比活性を有する。さらに本発明の別の形態によれば、前記ベニシリングアシラーゼ酵素は、単離形態で提供される。大規模なアシル化又は脱アシル化工程で使用する場合には固定化形態で使用するのが好適である。本発明はさらに、ベニシリングアシラーゼをコードされた形質転換宿主を培養し、単離形態のベニシリングアシラーゼを回収することからなるベニシリングアシラーゼの製造方法を提供する。これら及びその他の実施態様を以下に詳細に説明する。

#### 配列リストの簡単な説明

配列リスト1：*Alcaligenes faecalis*のベニシリングアシラーゼ遺伝子のヌクレオチド配列及び誘導された新規pac酵素のアミノ酸配列。

配列リスト2：*tac*プロモーターのヌクレオチド配列。

配列リスト3：*trp*プロモーターのヌクレオチド配列。

配列リスト4：*p78*プロモーターのヌクレオチド配列

配列リスト5：*p f3*プロモーターのヌクレオチド配列

#### 特定の実施態様

新規な*Alcaligenes faecalis*ベニシリングアシラーゼ(pac)酵素は、それ自体公知の方法により単離することができる。例えば、*Alcaligenes faecalis*を適当な培養培地で増殖させることにより可能であり、培地は例えばpH6-8、特にpH7で任意にインデューサーKPAを含む特

10

4

にリン酸バッファーで緩衝化された緩衝溶液中の酵母抽出物とすることができる。任意の*Alcaligenes faecalis*株を使用することができる。酵素はそれ自体公知の方法で精製するが精製は好ましくは、第1に例えば、エステル化セルロースで行い、次に例えば特にヒドロキシアパタイトを使用したゲロクロマトグラフィーを使用する二段階で行うのが好ましい。精製酵素は、好ましくは各サブユニットのNH<sub>2</sub>-末端の、ペプチドフラグメントのアミノ酸分析にかけることができる。決定されたアミノ酸配列から、該遺伝子配列検出のためのプローブを得ることができる。*A. faecalis*のベニシリング加水分解活性が精製ベニシリングアシラーゼに存在することが初めて示され、該酵素は26 kD及び59 kDの大きさの2つのサブユニットのヘテロ2量体からなることが判明した。*A. faecalis pac*遺伝子は、それ自体公知の方法でクロモソームDNAから同定することができる。該遺伝子は、実質的に図1に示した構造を有する。図1に示した配列とハイブリダイズすることができ、実質的に同じ構造の酵素をコードする全ての相同遺伝子は、本発明に包含されるものと理解される。ハイブリッド安定性についての種々の因子の影響の分析から得られた下記式、 $T_m = 81 + 16 \cdot 6 (\log 10 C_1) + 0 \cdot 4 (\% G+C) - 600 / n - 1 \cdot 5\%$ 不適合 (Ausubal et al., 前出)  $n =$  プローブの最短鎖長  $C_1 =$  イオン強度 (M)  $G+C =$  塩基組成は、DNA-DNAハイブリダイゼーション法を使用して相同性のどのレベルが検出できるかを決定するのに使用することができる。従って、「実質的にその構造」という用語は、コンサーバティブ突然変異を含む配列を包含し、そのような配列では同じアミノ酸をコードするが、上記式に従いDNA中35%まで、典型的には10%まで異なってもよい。新規な*A. faecalis pac*酵素のアミノ酸配列と、明らかにされている*E. coli*ベニシリングアシラーゼのアミノ酸配列 (Schumacher et al., 前出)との相同性の比較によれば、全体的な相同性は43%にすぎないことが判明した。さらに、*Kluyvera citrophila pac*酵素の公知のアミノ酸配列 (Barbero et al., 前出)との相同性も44%にすぎなかった。*A. faecalis pac*遺伝子は、*E. coli*中それ自身のプロモーター及び/又は誘導可能*tac*又は*trp*プロモーターの指令下に発現させることができる (第4図及び第5図参照)。ベニシリングアシラーゼ生産の結果は極めて良好であった。このpac遺伝子を*tac*プロモーターと共に使用した場合、生産は当初*A. faecalis*株と同等であったが、後者の場合はインデューサーとしてフェニル酢酸カリウムが必要であった。*trp*プロモーターの制御下にある*A. faecalis pac*遺伝子を有する*E. coli*株は、何の誘導もなしに、上

5

記の株の5倍高いペニシリンGアシラーゼ産生を示す。これにより、両株における、高価なフェニル酢酸カリウムインデューサーを使用した誘導を避けることができる。相同DNAのみを有する生産株を得るために、A. faecalis自体への形質転換を行った。二つの異なる方法により、A. faecalisへのDNA形質転換を満足に行うことができた。先ず第1に、E. coliからA. faecalisへの広範囲宿主プラスミドの抱合体転移を行うことができた。第2に、RSF 1010レブリコンに基づくプラスミドによるA. faecalisのエレクトロポレーションをおこなうことができた(BIORADージーンバルサー)。A. faecalis遺伝子のクローニングに際しては、種々の転写配列を使用することができる。第1に、A. faecalispac遺伝子を、それ自体のプロモーターの制御下にあるA. faecalis中にクローニングできる。外部pac遺伝子を持たないA. faecalisと比較して、ペニシリンGアシラーゼの生産は非常に高くなり、フェニル酢酸カリウム誘導を殆ど必要としない。第2に、インデューサーとは別にE. colitrpプロモーターを使用すると、同様に高い量のペニシリンGアシラーゼが得られた。第3に、Pseudomonas aeruginosaファージpf3から得られた二つの発現エレメント、プロモーター-pf3及びp78(Luiten, PhD thesis, Nijmegen(1986))を使用すると、ペニシリンGアシラーゼの産生は、それ自体の又はE. colitrpプロモーターの制御下にある外部pac遺伝子を有するA. faecalisで得られたものよりもいくらか低かったが、それでも外部pac遺伝子を有しないA. faecalis株と比較すると改善されており、フェニル酢酸カリウム誘導に対する依存はずつと低い。先行技術は、ペニシリンGアシラーゼを単離形態で製造するためにA. faecalisを使用することを開始していない。また、新規なA. faecalisのペニシリンGアシラーゼ酵素の、E. coliのそれに対する改良された性質、あるいは組換DNA法を使用してA. faecalisからのペニシリンGアシラーゼの産生を増加させ容易にすることについてはいずれも今までの先行技術には提案されていない。特にグラム陰性微生物、好ましくはAlcaligenes又はEscherichia属の微生物、より好ましくはA. faecalis中にクローン下されたA. faecalispac遺伝子を使用して産生されるペニシリンGアシラーゼは、極めて多量に産生される。さらに、該ペニシリンGアシラーゼの安定性及び特に比活性は、今まで公知のペニシリンアシラーゼのものよりもはるかに高い。A. faecalisの精製調製物も得られ、これは現在公知のペニシリンアシラーゼのいずれよりも高い、好ましい基質ペニシリンGに対する比活性を示す。

10

20

30

40

50

6

さらに、この精製調製物をA. faecalisペニシリンGアシラーゼのE. coliペニシリンアシラーゼと比較した温度安定性を測定するに使用した。A. faecalisペニシリンGアシラーゼの安定性は、E. coliペニシリンGアシラーゼのそれよりも有意に優れており、工業的条件下で長期間使用することができる。本発明はさらに、工業的過程において好ましく使用される、固定化形態のペニシリンGアシラーゼを提供する。その上に酵素を固定するキャリアーは、典型的には、任意にキトサンで架橋されたゼラチン、酸化アルミニウム、酸化ケイ素、イオン交換樹脂、アクリレートビーズ等であり、例えばEupergit(商標)である。以下の実施例により、本発明をさらに説明する。

#### 材料及び方法

##### アシラーゼ遺伝子のクローニング及び検出

全体的なクローニング方法は、Maniatis et al. (1982及び1989, Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory) 又はAusubel et al. (1987, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons Inc., New York) 又はB. Perbal (1988, A Practical Guide to Molecular Cloning, 第2版, John Wiley and Sons Inc., New York) に記載されているように行った。これらのハンドブックは、rDNA分子の構築及び增幅のプロトコール、遺伝子ライブラリーの作製方法及び部位特異的又はランダムなDNAミューテーション惹起のプロトコールについて詳細に記載している。DNA操作に使用した酵素は、市場の供給者から購入しその説明に従い使用した。プラスミド及びE. coliクローニング宿主は、The Phabagen Collection(Utrecht)のような公共のカルチュアコレクションから入手した。

#### 培地

フェニルアセチルL-ロイシン(fal)の選択培地は、(Garcia et al 同書)に記されているように調製した。最小プレートは以下の通りある: M63最小アガー、2 g/lグルコース、1 mg/lチアミン、10 mg/lL-プロリン及び適当な抗生物質(50 μg/ml クロラムフェニコール(cap)又は25 μg/mlアンピシリン(amp))。アシルL-ロイシンの存在下で唯一増殖したE. coliHB101(Leu<sup>-</sup>)の形質転換体がアシラーゼ遺伝子を有しているものとした。

最小E\* 培地: 16 g/l Difco アガー、芽胞因子(sporule element) 0.2 g/l MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 10 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>,

3. 5 g/l Na<sub>2</sub>(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1. 6 g/l クエン酸ナトリウム

4 x LBC 培地

酵母エキス 20 g/l, パクトトリプトン 40 g/l, NaCl 10 g/l, cas アミノ酸 (cas amonoacid) 4 g/l, バシルドン 0. 25 g/l, (消泡剤 86-013, Basildon Chemical Corporation), pH 7. 0. AF (A. faecalis) 培地酵母エキス 15 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 H<sub>4</sub>O 4. 5 g/l, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3. 4 g/l, pH 7. 0 (誘導の場合: フェニル酢酸カリウム (KPA) 1. 0 g/l)

2 x TY 培地

1.6 g/l パクトトリプトン, 10 g/l 酵母エキス, 5 g/l NaCl。フェニルアセチルロイシンは LGSS, Transfer-bureau Nijmegen から購入した。

A. faecalis 株 ATCC 19018 (NCTC 415 としても寄託) を A. faecalis pac 遺伝子の供与株、及び組換プラスミドの宿主として使用した。

E. coli 株 JM101, WK6 及び HB101 (Phabagen, Utrecht) を組換プラスミドの宿主として使用した。実施例1

A. faecalis ベニシリニアシラーゼの精製及び特性化

A. faecalis 株 ATCC 19018 を AF 培地で増殖させた。細胞を遠心分離により回収し、下記のバッファー: Tris 0. 1M pH 8. 0; EDTA 0. 2 mM; リゾチーム 0. 02 mg/ml に再懸濁し、30°Cで2時間インキュベートした。細胞断片は遠心分離により除去した。ベニシリニアシラーゼ (pac) を2段階で精製した。最初のものは、カルボキシメチルセルロース (CM-52 Whatman) により得た。第2のものは、ヒドロキシアバタイトゲルクロマトグラフィー (Biogel HTP, Biograd) を通して混入タンパク質を除去することにより得た。得られた純粋な pac は、二つの異なるサブユニットからなることが示された。この小サブユニット ( $\alpha$ ) と大サブユニット ( $\beta$ ) の NH<sub>2</sub>-末端アミノ酸分析を行った。結果は以下の通りである。

サブユニット  $\alpha$  (26 KDa) NH<sub>2</sub>-Q-X-Q-X-V-E-M-X-T

サブユニット  $\beta$  (59 KDa) NH<sub>2</sub>-S-N-L-W-S-T-X-P-E-X-V

実施例2

A. faecalis ベニシリニアシラーゼ遺伝子のクローニング

A. faecalis (ATCC 19018) のクロ

モソームDNAを単離し、Sau3Aにより部分的に消化した。4 kbから7 kbの範囲のフラクションを精製しベクター pACY184 中に結合し、これをBamH I で消化した。DNAを E. coli HB101 中に形質転換し、fa1-プレート上にプレート化した (方法の項参照)。二つの陽性クローニング pAF1 と pAF2 が同定された。これらのクローニングは、Serratia marcescens オーバーレイ法 (Meervoet et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 25, 372-378 (1987)) による試験でも陽性であった。pAF1 プラスミドの 6. 4 kb インサートを図1に示した。該遺伝子の位置決定は、A. faecalis pac の  $\beta$  サブユニットの NH<sub>2</sub>-末端配列について設計したオリゴヌクレオチドを使用して行った。下記のオリゴヌクレオチドを pAF1 インサート上のハイブリダイゼーションプローブとして使用した: AGC AAC C TG TGG AGC A/C C/G C TGCC CG GAG TGC GT 制限地図上のハイブリダイゼーションシグナルの位置から、A. faecalis pac 遺伝子の方向を決定した (図1)。

#### 実施例3

A. faecalis ベニシリニアシラーゼの配列決定

前記 6. 4 kb インサートの 3. 9 kb Sau3A-NdeI サブクローニングが pac 活性を与え、3. 1 kb Sau3A-Sph1 フラグメントは非活性であることが示された (図1)。3. 9 kb インサートの DNA 配列は、pTZ18R 及び pTZ19R (Parmaclia) 中の適当なフラグメントのデオキシン配列決定により行った。A. faecalis pac をコードする DNA 配列及び得られるアミノ酸配列を配列リスト1 に示した。得られたアミノ酸配列から、A. faecalis pac は単一の大ペプチド鎖としてコードされ、これがプロセッシングを受けて二つの異なるサブユニット、即ち  $\alpha$  及び  $\beta$  となると結論される。該前駆体の 5' 部位に、該酵素のペリプラズムへのトランスロケーションに関わる典型的なシグナル配列がみられる。

#### 実施例4

E. coli におけるベニシリニアシラーゼの発現

プラスミド pAF1 を SalI で消化し、4. 8 kb フラグメントを精製した。該フラグメントを、SalI 直線化ベクター pMCT-NdeI に結合した。この後者のベクターは、プラスミド pMc5-8 (EP-A-0351029) から、 tac プロモーターを含むフラグメント、続いて RBS 部位及び NdeI クローニング部位をインサートすることにより構築した (図2)。E. coli HB101 中に形質転換した後、得られたプラスミド pMcTAF1A (図3) は、それ自体のプロモーター及び/又は誘導可能 tac プロモーター (DeB

oer et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 80, 21 (1983) の作用下に *pac* を発現する。 *pac* の発現レベルをさらに改善するために、二つの強力な *E. coli* プロモーターを正確な融合 (fusion) によりアシラーゼ出発コドンにクローニングした。このために、プラスミド pMcTA F1A のオリゴヌクレオチド部位指向性突然変異誘発 (Stanssens et al., 1989) を使用して NdeI 部位を ATG 出発コドンに構築し、プラスミド pMcTAF1ANde を得た。このプラスミドを NdeI で消化して再度環化し、 *tac* プロモーターをアシラーゼ遺伝子の前に正確に位置させた (プラスミド pMcAFTac)。他のプロモーターをインサートするために、 pMcTAF1Nde を EcoRI 及び N\*

\* de I で消化し、大フラグメントをアガロースゲル上で精製した。トリプトファンプロモーターフラグメントを、6合成オリゴヌクレオチドを使用してこの pMcT AF1ANde の精製 EcoRI-NdeI フラグメントにインサートした。これらのプロモーターのDNA配列は、配列リスト 2 及び 3 に、またこれらのプロモーターの構造を図 4 及び図 5 にそれぞれ示した。これらのプロモーター構築物を *E. coli* HB101 中に形質転換し、 *pac* の発現について試験した。表 1 は、 A. faecalis ATCC 19018 の発現レベルと比較した結果を示している。イソプロピルチオ β-ガラクトシド (IPTG) による *tac* プロモーターの誘導及びインドールアクリル酸 (IAA) による *trp* プロモーターの誘導も試験した。

表 1: *E. coli* 中の *pac* の発現

株	KPA	IAA	IPTG	PAC 単位*
<i>A. faecalis</i> ATCC 19018	-	-	-	0.1
<i>A. faecalis</i> ATCC 19018	+	-	-	1
pMcAFTac	-	-	-	1
pMcAFTac	-	-	+	17
pMcAFTap	-	-	-	4
pMcAFTap	-	+	-	5

\* KPA を含む培地中の *A. faecalis* ATCC 19018 を 1.0 として標準化した相対単位

種々のプラスミドを含む *E. coli* HB101 を 4XLBC 中で 24 時間成育させた。 *A. faecalis* は、 AF 培地中で 24 時間成育させた。

#### 実施例 5

##### *A. faecalis* 中におけるペニシリニアシラーゼの発現

*A. faecalis* 中への遺伝情報の安定な転移を可能にするため、DNA トранスフォーメーション系及び安定なクローニングベクターを研究する必要があった。驚くべきことに、 Friedman et al., Gene 18, 289-296 (1982) に記載された方法を下記の改変を加えて使用すると、プラスミド pKT248 (Bagdasarian et al., Gene 16, 237-247 (1981)) の *A. faecalis* への 3 世代交配 (triparental mating) が可能であることが判明した。ヘルバープラスミド pRK2013 (Figurski & Helinski, Proc. Natl. Acad. Sci. 76, 1648 (1979)) を有する *E. coli* MC1061 を *E. coli* HB101 (pKT248) 及び *A. faecalis* 感受性株と 2 × TY アガーブレート上で混合し

た。一ブレートを 30°C で一晩インキュベートし、コンジュゲーションを生起させた。クエン酸塩、芽胞因子及び選択抗生物質量 (50 μg/ml) 及び cap (25 μg/ml) を含む最小 E\* 培地からなる選択アガーブレートに、前記コンジュゲーションブレートをレプリカした。30°C 一晩のインキュベートを行う。栄養要求マーカーにより *E. coli* 株について逆選択する。次に *A. faecalis* コロニーを 300 μl/ml ストレプトマイシンを含む 2 × TY ブレート上に展開する。*A. faecalis pac* 遺伝子のサブクローニングをプラスミド pKT248 中の单一の SaalI 部位に行った。プラスミド pAF1 の Tth I I I - HpaI フラグメントを単離し、クレノーポリメラーゼにより充填した。直線化した pKT248 の SaalI 部位もプラント化し、 *E. coli* HB101 中への形質転換及び fal ブレート上での選択によりプラスミド pKTAF (図 6) を得た。このプラスミドを単離した後、上述した三世代交配法により *A. faecalis* 中に移した。得られた株を *A. faeca*

11

L. lis 増殖培地と共に振盪フラスコ中で増殖させ、当初の株と比較した。表2から判るように、pKTAFAを有する株におけるpac産生は高度に改善されている。さらに、インデューサーKPAがなくても高い産生が得られることが判る。これにより工業用培養培地から高価なインデューサーKPAを除外することができる。pac遺伝子の前にある非均一プロモーターを試験するために、pMcAFtrp, pMcAFpf3及びpMcAFp78のそれぞれのEcoRI-SalI フラグ\*

12

\*メントを、EcoRI, SalI直線化ベクターpJR D215 (Davison et al., Gene 51, 275-280 (1987)) 中にサブクローニングした。pJRDAFtrp, pJRDAFpf3及びpJRDAFp78としてE. coli HB101中に得られた3つのプロモーター構築物を次にA. faecalis ATCC 19018中に移した。これらのプラスミドからのpacの発現をKPAの存在下及び非存在下に試験した(表2)。

表2: A. faecalis 形質転換体中のpacの産生

株	KPA	IAA	PAC単位*
pKT24B	-	-	0.1
pKT24B	+	-	1
pKTAFA	-	-	18
pKTAFA	+	-	22
pJRDAFtrp	-	-	18
pJRDAFtrp	-	+	19
pJRDAFpf3	-	-	5
pJRDAFpf3	+	-	8
pJRDAFp78	-	-	3
pJRDAFp78	+	-	5

\*KPAを含む培地中のA. faecalis ATCC 19018を1.0として標準化した相対単位。全てのプラスミドは、A. faecalis ATCC 19018への3世代交配により転移させた。プロモーターp78及びpf3はファージpf3から選択した(Luiten, 前出)。これらのプロモーターのDNA配列は、配列リスト4及び5にそれぞれ示し、これらのプロモーターの構造は図7及び図8にそれぞれ示した。

実施例6

A. faecalis ベニシリンアシラーゼの安定性  
以下の手順を使用して、A. faecalis ベニシリ  
ンアシラーゼ及びE. coli ベニシリ  
ンアシラーゼを温度安定性について試験した：100mMリソ酸ナ  
トリウム, pH 7.5 液中、酵素溶液を種々の温度で 40

5分間インキュベートする。50mMベニシリングを基  
質として35℃で残存活性を測定した。5分後に、10  
0%, 50%及び0%活性を示す温度を決定した。表2  
から、A. faecalis 酵素は、E. coli 酵  
素よりも有意に安定であることが判る。

	100%	50%	0%
<u>A. faecalis</u>	45 ℃	58.0 ℃	66 ℃
<u>E. coli</u> 5K	40 ℃	54.8 ℃	60 ℃

B. coli 5Kの酵素調製物は、Produktions Gesellschaft für Biotechnologie  
Braunschweig (Mayer et al., 前出)より入手した。

## 配列リスト1

配列No.1

配列タイプ: ヌクレオチドと対応するタンパク質

配列長: 2451塩基対

鎖: 一本鎖

トポロジー: 直線

分子タイプ: ゲノミック

微生物: Alcaligenes faecalis

特徴: 1 から 2451 bp ベブチド

性質: ベニシリンアシラーゼをコードする遺伝子

ATG CAG AAA GGG CTT GTT CCT ACC GGG CTT GTG GCG CGC CGT TTG ATC Met Gln Lys Gly Ile Val Arg Thr Gly Leu Val Ala Ala Gly Leu Ile 1 5 10 15	48
TTC CGT TGG CGG CGA CGG ACC CAC GCG CAA GTC GAG TCG CTA GAC Leu Gly Trp Ala Gly Ala Pro Thr His Ala Gln Val Glu Ser Val Glu 20 25 30	96
GTC ATG CGG GAC ACT TAT GGC GTC CGG CAC GTC TTT GCG GAC AGC CMC Val Met Arg Asp Ser Tyr Gly Val Pro His Val Phe Ala Asp Ser His 35 40 45	144
TAT GGC TGT TAT TAC GGC TAT GGT TAT GCG GTC GCC CAA GAC CGT CTG Tyr Gly Leu Tyr Tyr Gly Tyr Gly Tyr Ala Val Ala Gln Asp Arg Leu 50 55 60	192
TTC CAG ATG GAC ATG GCG CAT CGC TCC TTT GTC GGC ACA ACC GCG GCG Phe Gln Met Asp Met Ala Arg Arg Ser Phe Val Gly Thr Thr Ala Ala 65 70 75 80	240
GTC TTA GCG CCT CCT GAG CAA GAT GGC TAC GTC AAC TAC GAC ATG CAG Val Leu Gly Pro Gly Glu Gln Asp Ala Tyr Val Lys Tyr Asp Met Gln 85 90 95	288
GTC CCG CAG AAC TTC ACC CGG GCF TCC ATA CAG CGG CAG ATC GCG GCG Val Arg Gln Asn Phe Thr Pro Ala Ser Ile Gln Arg Gln Ile Ala Ala 100 105 110	336
TTC TCC AAG GAT GAG CGC GAT ATT TTT CGT GGC TAT GCG GAT GGC TAT Leu Ser Lys Asp Glu Arg Asp Ile Phe Arg Gly Tyr Ala Asp Gly Tyr 115 120 125	384
AAC GCG TAT CTG GAG CGC GTC CGT CGC CCT GAG TTC CTG CCC AAR Asn Ala Tyr Leu Glu Gln Val Arg Arg Arg Pro Glu Leu Leu Pro Lys 130 135 140	432

## 配列リスト1(続き)

GAA TAT GTG GAT TTT GAT TTC CAG CCC GAG CGG CCG ACC GAC TTT GAT 145 Glu Tyr Val Asp Phe Asp Phe Gln Pro Glu Pro Leu Thr Asp Phe Asp 150 155 160	480
GTG GTC ATG ATC TGG GTC GGC TCC ATG GCC AAT CGC TTC TCC GAC ACG Val Val Met Ile Trp Val Gly Ser Met Ala Asn Arg Phe Ser Asp Thr 165 170 175	528
AAT CTG GAA GTG ACG GCA CGC GCC ATG CGT CAG TCT CTG GAG AAA CGG Asn Leu Glu Val Thr Ala Leu Ala Met Arg Gln Ser Leu Glu Lys Gln 180 185 190	576
CAC GGC CGG GAA CGA CGC CGT GCC TTG TTT GAT GAG CTG CGG TGG ATC His Gly Pro Glu Arg Gly Arg Ala Leu Phe Asp Glu Leu Leu Trp Ile 195 200 205	624
AAT GAC ACA ACA GCT CGC ACT CGC GTF CGG GCG CGC GCT CGC GAG CGC Asn Asp Thr Thr Ala Pro Thr Thr Val Pro Ala Pro Ala Ala Glu His 210 215 220	672
AGG CGG CGA CGA CGA CGG AGC CGC GAT CTG GCT CGT GAT GTT TCC TCG Lys Pro Gln Ala Gln Ala Gly Thr Gln Asp Leu Ala His Val Ser Ser 225 230 235 240	720
CCA GTA CTG GCT ACC GAG CTA GAG CGC CGG GAC AAC CGC TGG CGG CGC Pro Val Leu Ala Thr Glu Leu Glu Arg Gln Asp Lys His Trp Gly Gly 245 250 255	768
GCT GAC CGG GAC TTG GCG CGC AAG CCT AAC AAC CGT TGG AGC ACT CGC Arg Gly Pro Asp Phe Ala Pro Lys Ala Ser Asn Leu Trp Ser Thr Arg 260 265 270	816
CCC GAG CGA CTG CGG GAG CGC TCG ACC GTC CTG ATC AAC CGC CGA CGC Pro Glu Arg Val Gln Glu Gly Ser Thr Val Leu Ile Asn Glu Pro Gln 275 280 285	864
TTT GGC TGG TAC AAC CGG GCG TAC ACC TAT GGC ATT GGC TTG CAT CGC Phe Gly Tyr Tyr Asn Pro Ala Tyr Thr Tyr Gly Ile Gly Leu His Gly 290 295 300	912
GCC CGC TTG CGT GCG GCG GGT AAT ACC CCT TTT GGC TAT CGG ATC GTC Ala Gly Phe Asp Val Val Gly Asn Thr Pro Phe Ala Tyr Pro Ile Val 305 310 315 320	960
CTG TTG CGC ACC AAT ACC GAG ATT GGC TGG CGG GCG ACT GCT GGC CGG Leu Phe Gly Thr Asn Ser Glu Ile Ala Thr Gly Ala Thr Ala Gly Pro 325 330 335	1008
CAA GAT GTG GTG GAC ATA TAT CAG GAA AAA TTG AAC CCC TCG CGT GCC Gln Asp Val Val Asp Ile Tyr Gln Glu Lys Leu Asn Pro Ser Arg Ala 340 345 350	1056

## 配列リスト1 (続き)

GAT CAG TAC TGG TTC AAC AAT GCC TGG CGC ACC ATG GAG CAG CCG AAC Asp Glu Tyr Trp Phe Asn Asn Ala Trp Arg Thr Met Glu Glu Arg Lys 355 360 365	1104
GAA CCT ATC CAG CTA CCC CCT CAG CCT GAT CCC CAA ATG ACG ATC TCC Glu Arg Ile Glu Val Arg Gly Glu Ala Asp Arg Glu Met Thr Ile Trp 370 375 380	1152
CGC ACC CTC CAC CGC CCT CGG ATG CAG TTT GAT TAC CAT CAG CGC CGC Arg Thr Val His Gly Pro Val Met Glu Phe Asp Tyr Asp Glu Gly Ala 385 390 395 400	1200
GCG TAC AGC AAG AAA CGG ACG TGG GAT CGC TAT GAG GAG CGG TCC TTG Ala Tyr Ser Lys Arg Ser Trp Asp Gly Tyr Glu Val Glu Ser Leu 405 410 415	1248
CCT GCC TGG TTG AAC GAG GCC AAG GGC AAC TGG ATC GAT CGT TCC TTG Leu Ala Trp Leu Asn Val Ala Lys Ala Arg Asn Trp Thr Glu Phe Leu 420 425 430	1296
GAT CAA GCC ACG AAG ATG GCG ATT TGG ATC AAC TGG TAC TAC GCC GAC Asp Glu Ala Ser Lys Met Ala Ile Ser Ile Asn Trp Tyr Tyr Ala Asp 435 440 445	1344
ARG CGC GGC AAT ATT GGT TAT GTC TGG CGC GGC TTC CTC CGC CGC CGT Lys His Gly Asn Ile Gly Tyr Val Ser Pro Ala Phe Leu Pro Glu Arg 450 455 460	1392
CCT GCC GAT CAG GAC ATC CGT GTC CCT GCC AAG GCG GAT CGC ACC ATC Pro Ala Asp Glu Asp Ile Arg Val Pro Ala Lys Gly Asp Gly Ser Met 465 470 475 480	1440
GAG TGG CTG GGC ATC AAG AGT TTC GAC GCG ATT CGC AAC TAC AAC Glu Trp Leu Gly Ile Lys Ser Phe Asp Ala Ile Pro Lys Ala Tyr Asn 485 490 495	1488
CCA CCC CAG CGC ATT CTG GTC AAC TGG AAC AAC ATT CCT CGG CGC CGC Pro Pro Glu Gly Tyr Leu Val Asn Trp Asn Asn Lys Pro Ala Pro Asp 500 505 510	1536
AAA ACC AAT ACG GAT ACT TAC ATT TGG ACC TAT GGC GAC CGC ATG AAT Lys Thr Asn Thr Asp Thr Tyr Tyr Trp Thr Tyr Glu Asp Arg Met Asn 515 520 525	1584
GAA CTG CTG ACT CGC TAC CGC CGC AAA CGC CTC TTC ATT GTC CGC CGC Glu Leu Val Ser Glu Tyr Glu Glu Lys Asp Leu Phe Ser Val Glu Glu 530 535 540	1632
ATC TGG GAG TTC AAT CAA AAA GCC TCC TAT ACC GAT GTC AAC TGG CGC Ile Trp Glu Phe Asn Glu Lys Ala Ser Tyr Ser Asp Val Asn Trp Arg 545 550 555 560	1680

## 配列リスト1 (続き)

TAC TTC CGC CCA CAT CTG GAA AAG CTG CGG CAA CGG CTG CGG CCC GAC Tyr Phe Arg Pro His Leu Glu Lys Leu Ala Gln Gln Leu Pro Ala Asp 565 570 575	1728
GAT ACC AGC AAC CGG CGG CTG ACG ATG TTG CTC CGC TGG GAT GGA ATG Asp Ser Ser Lys Ala Ala Leu Thr Met Leu Leu Ala Thr Asp Gly Met 580 585 590	1776
GAA CGG GAT CAG CGA CGG CAA AAT GCC CGG CGG CGG GTG CTC TTC Glu Gln Asp Gln Gly Gly Gln Asn Ala Gly Pro Ala Arg Val Leu Phe 595 600 605	1824
AAG ACC TGG CGG GAA GAA ATG TAC AAC CGG CGC TTG ATT CGG CGG CTC Lys Thr Trp Leu Glu Glu Met Tyr Lys Gln Val Leu Met Pro Val Val 610 615 620	1872
CCT GAA TCG CAT CGC GCG ATG TAT AGC CGG ACT GGT TTT CCT ACC CGG Pro Glu Ser His Arg Ala Met Tyr Ser Gln Thr Gly Phe Ala Thr Gln 625 630 635 640	1920
CAA CGT CCC AAC CGC CGG TCC ATC AAC TTG AGC ATG GGC ACC AAC GTC Gln Gly Phe Asn Pro Gly Ser Ile Asn Leu Ser Met Gly Thr Lys Val 645 650 655	1963
TTG TTG CGT GGC TTG CGC CGC GAA CGG CGC CCT CGC AAC CGT CCT GTC Leu Leu Arg Ala Ile Val Ile Glu Ala His Pro Asp Pro Lys Arg Val 660 665 670	2016
AAT GTC TTT CGT GAG CGT TCG TCT CGG GAA ATC ATG CAC ACA CGT TTC Asn Val Phe Gly Glu Arg Ser Ser Gln Glu Ile Met His Thr Ala Leu 675 680 685	2064
CAA AAC CGG CGC CGG TTA AGC CGG CGC CGG CGT CGG ATG GCG Gln Asn Ala Gln Ala Arg Leu Ser Gln Glu Gln Gly Ala Gln Met Ala 690 695 700	2112
CGC TGG ACC ATG CGG ACC TCC CGC CAT CCT TTC ACC ACC GAC AAC TTC Arg Trp Thr Met Pro Thr Ser Val His Arg Phe Ser Asp Lys Asn Phe 705 710 715 720	2160
ATG GGA ACC CGG CGC ACC ATG CCT CGC HAT ACC TTT CGC TTT Acc GGC Thr Gly Thr Pro Gln Thr Met Pro Gly Asn Thr Phe Ala Phe Thr Gly 725 730 735	2208
TAT CGG AAC CGG CGC ACC GAA AAT AAC CGG CGC CGC TTT CAT CGC AMG Tyr Gln Asn Arg Gly Thr Glu Asn Asn Arg Val Val Phe Asp Ala Lys 740 745 750	2256
GCG GTC GAG TTC TCC GAC CGC ATG CGG CGC CGG CGA ACC CGT TTC ACC Gly Val Glu Phe Cys Asp Ala Met Pro Pro Gly Gln Ser Gly Phe Thr 755 760 765	2304

## 配列リスト1 (続き)

GAC CGC AAT GGA GTG CGC ACC CGG CAT TAT GAG GAT CGG CGC AAG TTG Asp Arg Asn Gly Val Arg Ser Pro His Tyr Glu Asp Gln Leu Lys Leu 770 775 780	2352
TAC GAG AAC TTC GAG TGC AAG ACC ATG GAT GTG ACC CAT CGG GAC ATT Tyr Glu Asn Phe Glu Cys Lys Thr Met Asp Val Thr His Ala Asp Ile 785 790 795 800	2400
CCT CGT AAT CGG CAA AGC AGC ACG ATG CTG TTG ATT CAG OCT CGG CCT Arg Arg Asn Ala Gln Ser Ser Thr Met Leu Leu Ile Gln Pro Gln Pro 805 810 815	2448
TAA End	2451

(12)

特開平4-228073

21

22

配列リスト2

配列No.2

配列タイプ：アクリオチド合成フラグメント

配列長：124塩基対

鎖：一本鎖

トポロジー：直線

分子タイプ：合成

特徴：bp 35-40 = "-35" 境域

bp 57-62 = "-10" 境域

bp 110-114 = シャインダルガルノ lac 遺伝子

性質：プロモーター活性(*tag*プロモーター)

GAATTOGAGC TCGAGCTTAC TCCGCCATCCC CCTGGTGACA ATTAAATCATC GGCTTCGTATA	60
ATGTCCTGGAA TTCTGAGCGG ATRACAAATT CACACAGGAA ACAGGATCCA AGGAAAAACA	120
TATG	124

配列リスト3

配列No.3

配列タイプ：アクリオチド合成フラグメント

配列長：151塩基対

鎖：一本鎖

トポロジー：直線

分子タイプ：ゲノミック

特徴：bp 84-89 = "-35"

bp 107-112 = "-10"

bp 134-139 = シャインダルガルノ

性質：プロモーター活性(*trp*プロモーター)

GAATTCAAGG CGCACTOOGG TTCTGGATAA TGTTTTTTCG GCGGACATCA TAACGGTTCT	60
GGCAAAATAATT CTGAAATGAG CTGTTGACAA TTAACTCGGG AACCTGTTAA CTAGTACGCA	120
AGTTCACGTA AAAAGGAGGT ATCCGACATAT G	151

## 配列リスト4

## 配列No.4

配列タイプ: ネクレオチド合成フラグメント

配列長: 114塩基対

組: 一本鎖

トポロジー: 直線

分子タイプ: ゲノミック

特徴: bp 23-28 = "-35" 領域

bp 48-51 = "-10" 領域

bp 100-103 = シャインダルガルノ p78

性質: プロモーター活性(pf3プロモーター)

GAATTCGATC GCAAAAAAGT ACTTGCAACT TCCCGAAACC CTGTCTAGAG TTCTAGGTGC	60
ATCTGAATGG AGCTCGGTAC CAACTCTTTT GCTTCCATTG AGGTGCCATCA TAATG	114

## 配列リスト5

## 配列No.5

配列タイプ: ネクレオチド合成フラグメント

配列長: 105塩基対

組: 一本鎖

トポロジー: 直線

分子タイプ: ゲノミック

特徴: bp 23-28 = "-35"

bp 48-51 = "-10"

bp 92-95 = シャインダルガルノ lac 遺伝子

性質: プロモーター活性(pf3プロモーター)

GAATTCGATC GCAAAAAAGT ACTTGCAACT TCCCGAAACC CTGTCTAGAG TTCTAGGTGC	60
ATCTGAATGG AGCTCGGTAC CGGGGGATCC AAGGAAAAAC ATATG	105

## 【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、A. f a e c a l l i s ベニシリソGアシラーゼ遺伝子領域の形態地図を示す。pAF1のインサートが示されている。

【図2】 図2は、プラスミドpMCTNdEの構造を示す。

【図3】 図3は、プラスミドpMCTAF1Aの構造を

示す。

【図4】 図4は、t a c プロモーターの構造を示す。

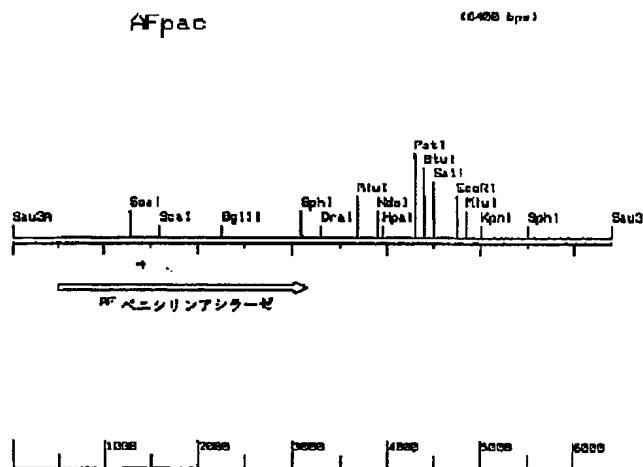
【図5】 図5は、t r p プロモーターの構造を示す。

【図6】 図6は、プラスミドpKTAFAの構造を示す。

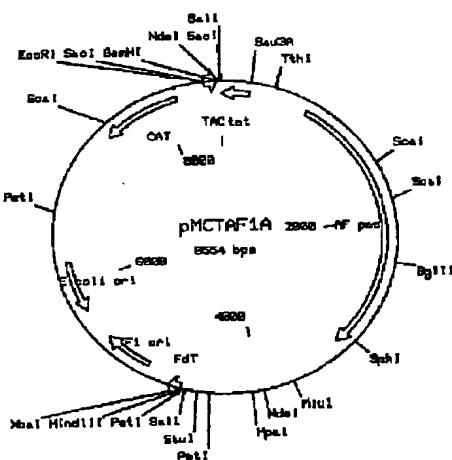
40 【図7】 図7は、p78プロモーターの構造を示す。

【図8】 図8は、pf3プロモーターの構造を示す。

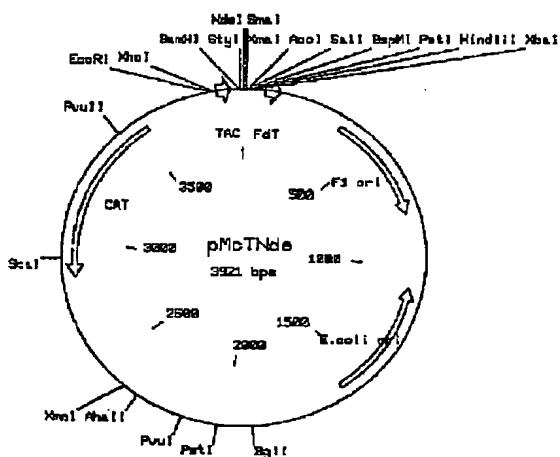
【図1】



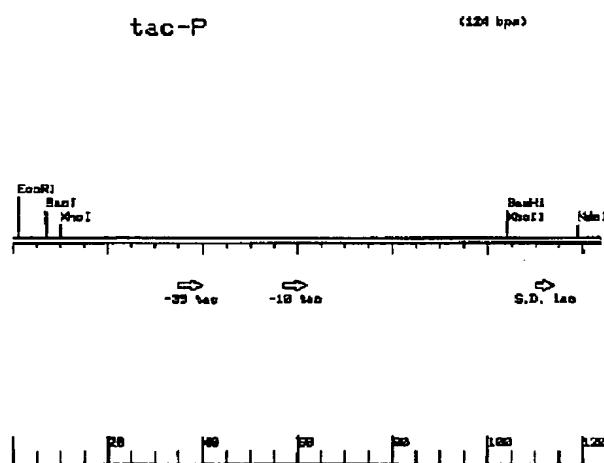
【図3】



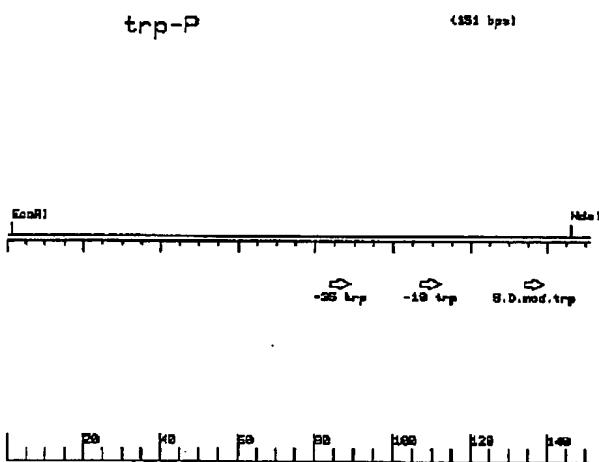
【図2】



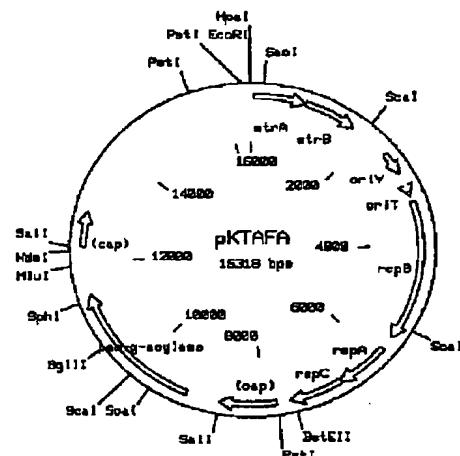
【図4】



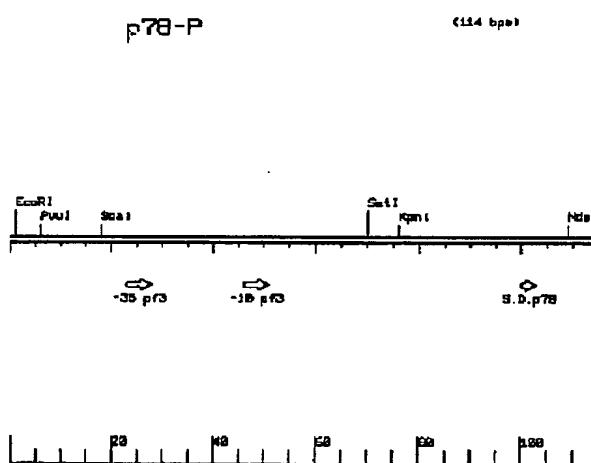
[図5]



[図6]



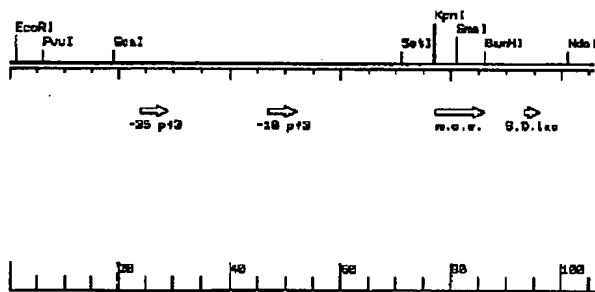
[図7]



【図8】

p f3-p

(125 bp)



## フロントページの続き

(51) Int. Cl. 5	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 R	1:19)			
(C 1 2 N	9/84			
C 1 2 R	1:05)			
(C 1 2 N	1/21			
C 1 2 R	1:05)			
(C 1 2 N	15/55			
C 1 2 R	1:05)			

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**